

円石藻 *Gephyrocapsa oceanica* の円石形成株と円石非形成株の環境応答の差異に関する研究

著者	加賀 敏樹
号	668
発行年	2000
URL	http://hdl.handle.net/10097/16295

氏 名(本籍) ^か加 ^が賀 ^{とし}敏 ^き樹

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 博 第 6 6 8 号

学位授与年月日 平 成 13 年 3 月 26 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院農学研究科環境修復生物学専攻
(博士課程)

学 位 論 文 題 目 円石藻*Gephyrocapsa oceanica*の円石形成株と円石非形
成株の環境応答の差異に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 谷 口 旭
教 授 秦 正 弘
教 授 菅 原 和 夫

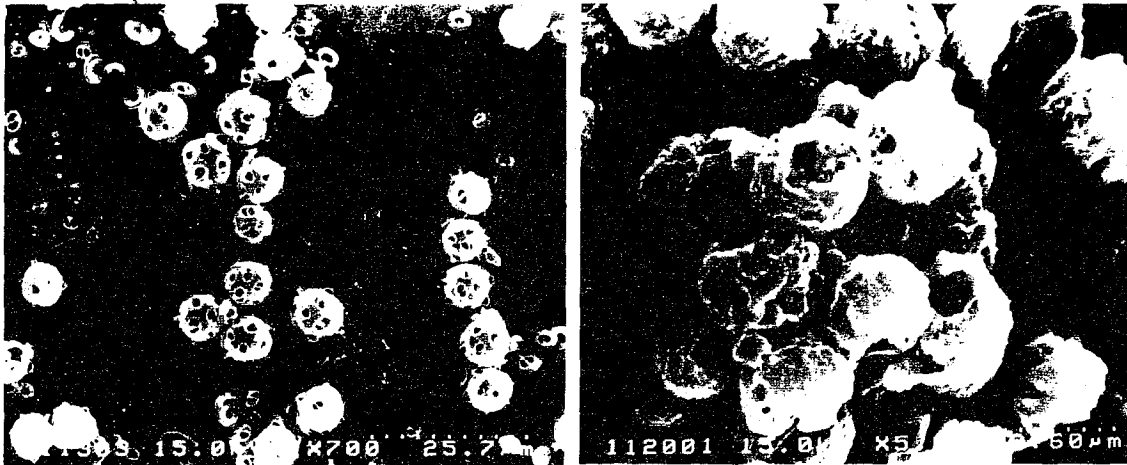
論文内容要旨

【はじめに】円石藻類は、世界中に分布するナノサイズの単細胞植物プランクトンであり、プリムネシウム藻綱に属す。細胞は炭酸カルシウムを主成分とする円盤状の円石で覆われていて、それがこの群の顕著な特徴となっている。円石はココリスとも呼ばれ、種によって異なる複雑な装飾を有するので、種の分類・同定の基準とされる。

円石藻類は、多数の円石を形成することにより、地球規模の環境に重要な影響を与えているといわれている。一方、円石藻類の生活史選択や環境嗜好については未だ十分な研究がなされていない。これは、多くの円石藻類が貧栄養塩の外洋環境に適応しているため、培養が困難であることによる。また、培養が成功した種であっても、長期間培養を続けているうちに円石を形成しなくなるという現象がよく起こるため、特徴的な円石についての研究が行えなくなるというように、体系的に整理された研究事例は極めて少ない。本研究では、同種でありながら円石を形成するタイプ(C type)と形成しないタイプ(N type)とを同時に培養した結果を相互比較することで、円石の機能的役割とその重要性を明らかにすることができた。

【材料と方法】C type は、1995 年 11 月に宮城県仙台湾から分離された株であり、現在に至るまで円石形成能を保ちつづけており、円石藻培養株としては、稀有な存在である。N type は、国立環境研究所微生物系統保存施設に保存されている株であり、分離後まもなくの間円石を形成していたが、培養を続けているうちに円石形成能を失った株である。本研究では、まず両タイプの形態的特徴を明らかにした後、両タイプが良好に増殖する培養条件を明らかにするために、松平 EDTA 培地をベースとして、いくつかの条件下で予備培養を行った。良好な増殖を示した条件を以下の本実験におけるコントロール区とした。本実験とは以下の様なものである。まず、炭酸塩を継続的に添加した場合と通気を行った場合の増殖応答を調べた。また、異なる炭素供給条件下における細胞炭素の安定同位対比の変動も調べた。さらに両タイプの炭素固定能力の差異を明らかにするために、放射性同位炭素を用いた実験を行った。次に、窒素およびリンの濃度変化に応じた円石形成と増殖速度の違いを調べた。それらの他、両タイプ間の微量金属およびビタミン類添加あるいは欠乏に対する応答の違いを比較した。

【結果と考察】



1. 形態的特徴：左は C type、右は N type の細胞を示している。C type は円石に覆われた典型的な形態の *Gephyrocapsa oceanica* であり、細胞から剥離した円石も散在している。N type は C type の細胞とは全く異なった外部形態をしている。C type より小さく、細胞表面は不定形の殻で覆われている。N type が *Gephyrocapsa oceanica* の細胞であることは、環境研究所によって確認された。
2. 予備実験：両タイプが良好な増殖を示す条件を明らかにするためにテストした条件は、水温、光、塩分、炭酸塩、アンモニア、微量金属、ビタミン類であった。予備実験の結果、水温 20℃、塩分 33‰、光 $200 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、炭酸塩および微量金属類は松平 EDTA 培地の標準濃度をコントロールとした。

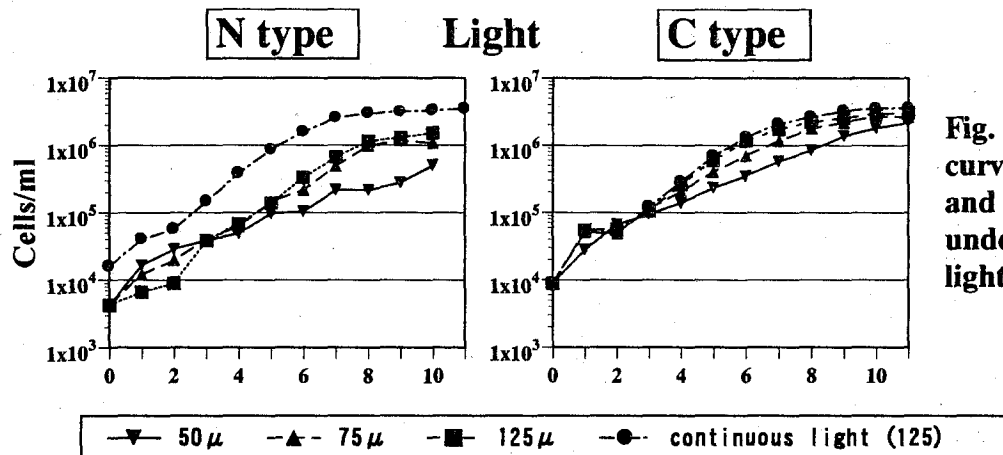


Fig. 1. Growth curves of N type and C type under different light conditions.

予備実験では、以上のようなコントロール条件を決定できた他に、両タイプの光条件に対する増殖応答の違いが示された。すなわち $50 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ という弱光条件でも、C type の細胞収量は 1ml 当たり 220 万細胞と高いが、N type では 50 万細胞であった(Fig.1)。これは、細胞を覆う円石が細胞内の葉緑体へ光を集めるレンズのような働きを持つとする Gartner and Bukry (1969)の仮説を裏

付ける結果であった。コントロール条件下では、細胞収量は N type の方で高く 1 ml 当たり 160 万であったのに対して、C type では 140 万細胞であった。炭素収量および一細胞あたりの炭素量は C type のほうが 2-3 倍高かった(Fig. 2)。C type では無機炭素が全炭素中の 60-65% を占め、N type では 85-95% が有機炭素で占められていた(Fig. 2)。

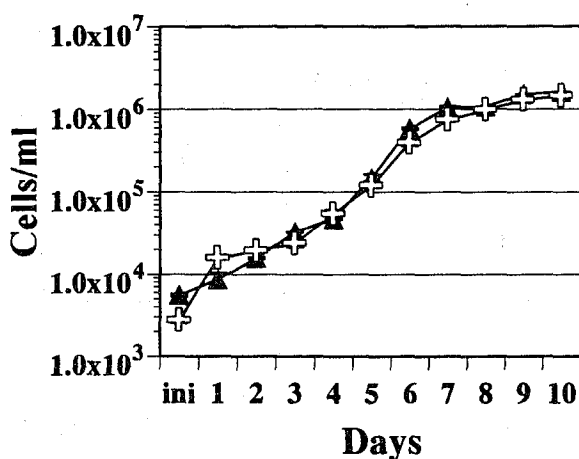
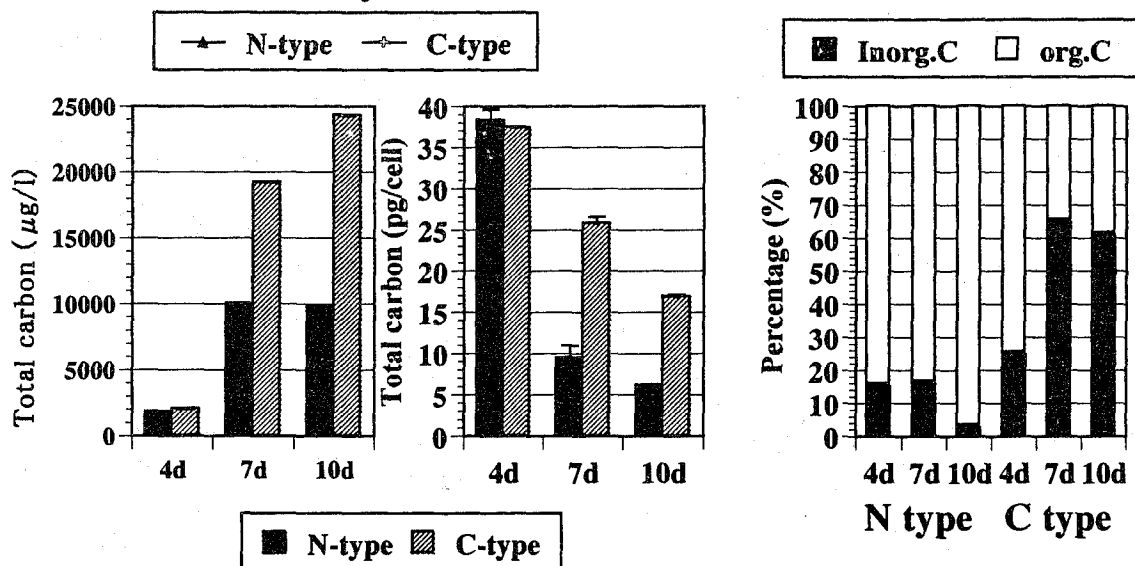


Fig. 2. Growth curves (upper), total C (lower left), total C/cell (lower middle) and percentage of inorganic and organic C (lower right) of C type and N type observed in the control medium.



また、C type のリン酸塩消費量は N type と比べて 2 倍ほど高いことがわかった。このことにより、円石形成にリンが特に必要な元素であることが示された。

3. 炭素供給に対する応答：0/D は炭酸塩無添加区、1/D や 2/D 等は 0.75 mol/l の炭酸水素ナトリウム溶液をそれぞれ 1 日に 1 ml あるいは 2 ml 加えた実験区を示している。炭酸塩添加および通気による CO_2 添加に対して両タイプの増殖速度および細胞収量が増加した(Figs. 3, 4)。両タイプとも炭酸塩無添加区では増殖速度および細胞収量は低下し、炭素律速の状態にあったと判断された。C type では炭酸塩の添加により一細胞当たりの炭素量が増加したが(Fig. 3)、このとき無機炭素量が増加していたことから円石形成量が増大したことがわかった(Fig. 3)。

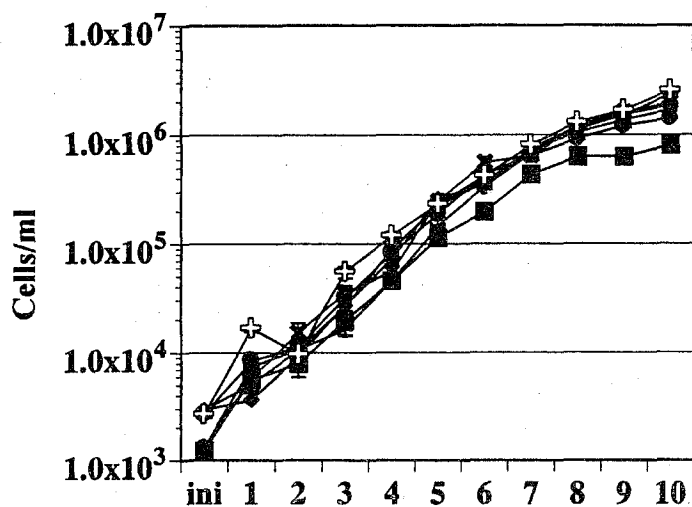
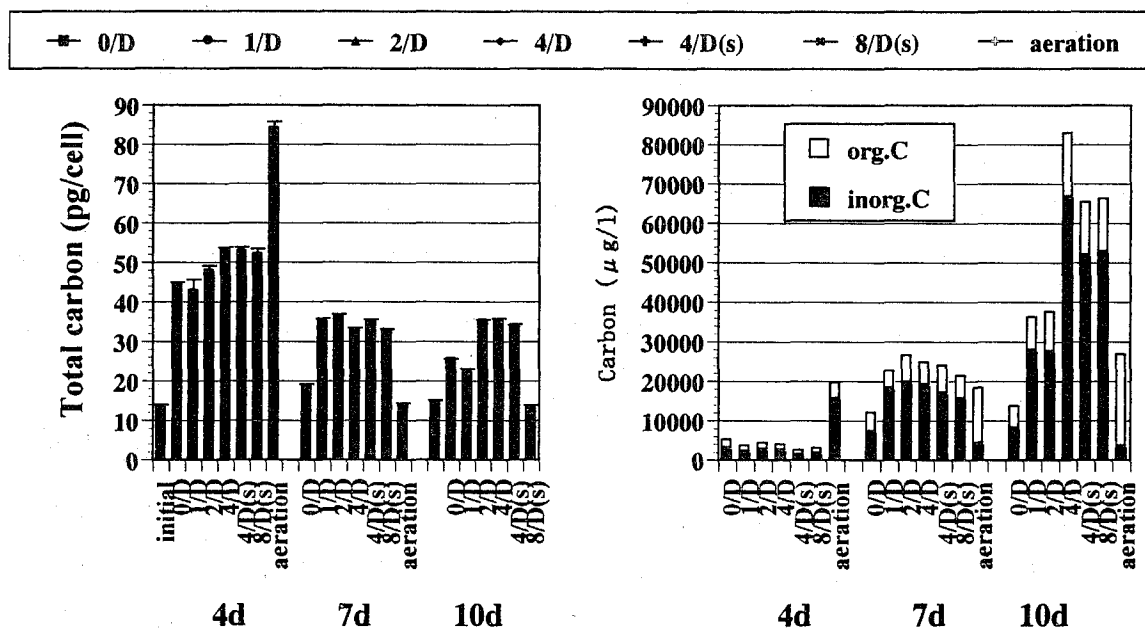


Fig. 3. Growth curves (upper), total C/cell (lower left) and inorganic and organic C yield (lower right) of C type at different carbon concentration.



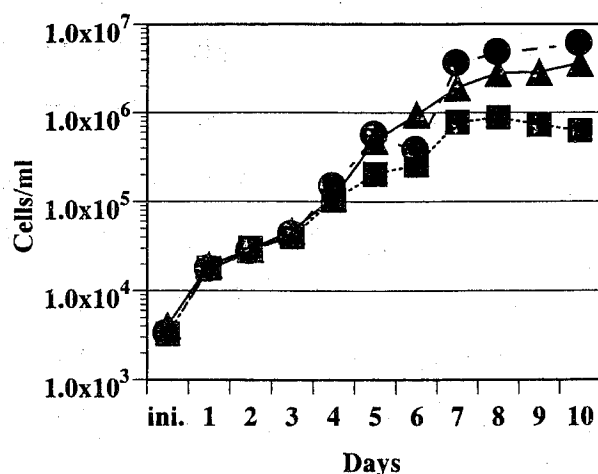
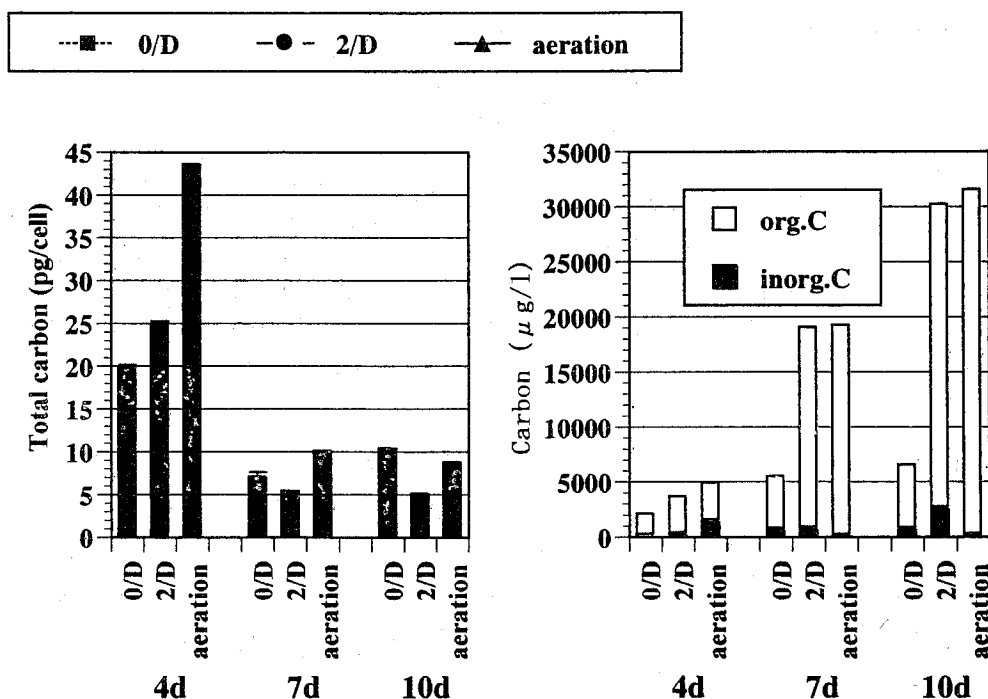


Fig. 4. Growth curves (upper), total C/cell (lower left) and inorganic and organic C yields (lower right) of N type at different carbon condition.



通気を行った結果、N type の細胞および炭素の収量は増加したが(Fig. 4)、これは N type の炭素固定が主に光合成によって起こることを示している。一方、C type では細胞収量とともに有機炭素収量が大幅に増加したのにも関わらず、総炭素収量はコントロールよりも減少した(Fig. 3)。これは、通気による CO₂ 吹き込みが円石溶解を招いたことだけによるのではない。このときに有機炭素量の増加が起っていたことに注目する必要がある。すなわち、コントロールでの有機炭素量が 9300 μg/l であったのに対して、通気区では有機炭素量が 23000 μg/l に増加していた。円石形成量が減少した一方で、有機炭素量が大きく増加したことは、石灰化よりも光合成を優先するように炭素利用経路を変えたことを示している。通気条件下では、通常のプランクトンのように細胞外から CO₂ を得る経路を優先させたものと考えることができる。

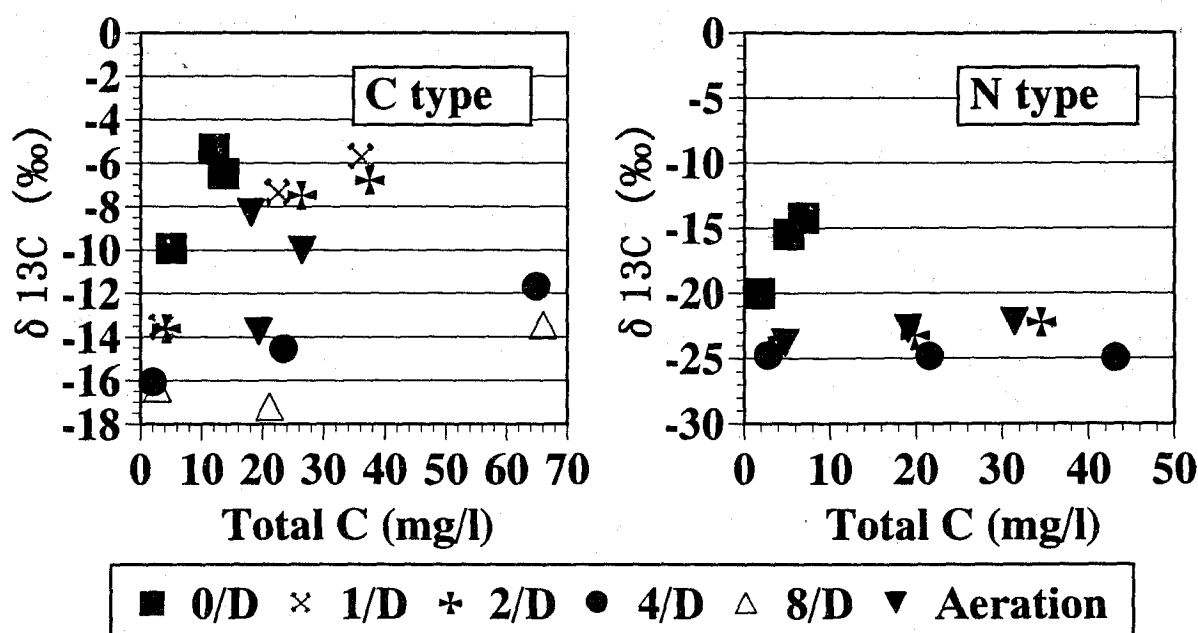


Fig. 5. $\delta^{13}\text{C}$ in the cells of C type (left) and N type (right) vs total C yield at different levels of carbonate concentration and in the aerated medium. $\delta^{13}\text{C}$ was measured at 4th, 7th and 10th days.

4. 安定同位対比の解析：C type では炭素収量が増加するのに伴って、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が上昇していった。上昇は特に 1/D と 2/D で顕著であったが、炭素供給量が高かった 4/D および 8/D では上昇の度合いは小さかった。0/D では $\delta^{13}\text{C}$ 値が常に高く、早い時期から炭素律速にあったと思われる。一方 N type では、0/D を除き、2/D、4/D および通気区ではともに炭素固定量が増加しても $\delta^{13}\text{C}$ 値には変化はなく、一定であった。炭素律速である程 $\delta^{13}\text{C}$ 値が高くなることから、C type の炭素要求量は N type と比べ大きいと解釈できる。

5. 放射性同位炭素を用いた実験： $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ をトレーサーにして、両タイプの有機あるいは無機画分への炭素取込み量を調べた結果、chl. *a* 量当たりの総炭素取込み量は C type の方が 2.5–3 倍高かった。また、C type では 67% が円石形成による無機態固定、33% が光合成による有機態固定へと分かれていた。有機炭素への取込み量は両タイプともほぼ同じ値であった。C type の炭素取込み速度が N type に比べて高かったのは、明らかに円石形成が原因している。円石形成のための炭素取込み速度は、光合成のための取込みよりも速いので、円石形成は細胞内に豊富な CO_2 プールを発生させることになり、それが光合成を促進していた可能性がある。

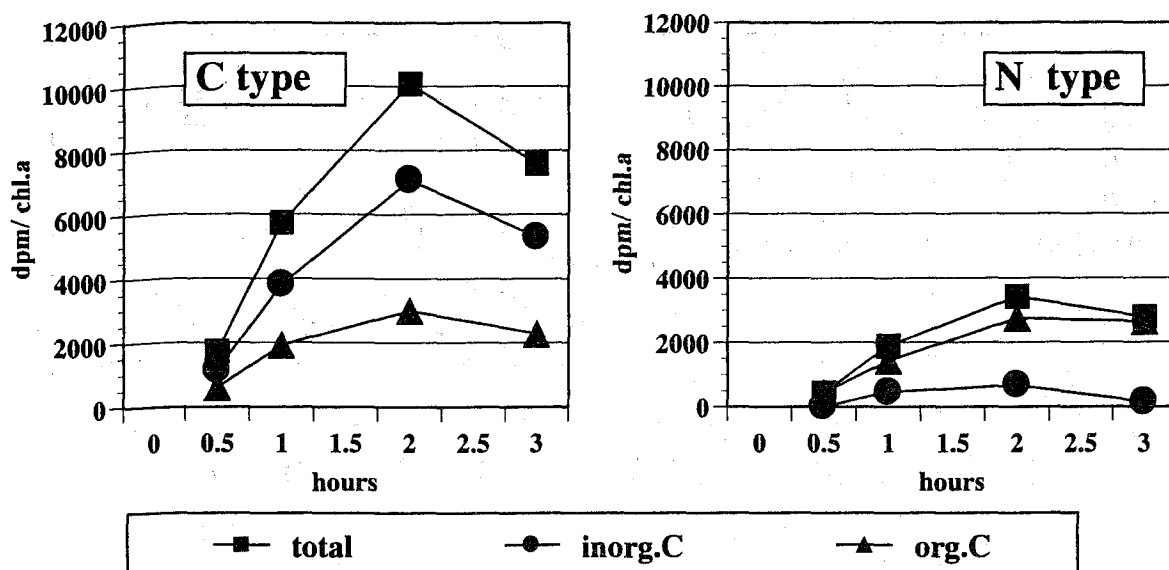


Fig. 6 Time course of ^{14}C assimilation into total, inorganic and organic carbon fractions in the cells of C type (left) and N type (right) of the coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* enriched with 0.5 ml of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ solution (1110000 dpm).

N type は、細胞外で発生させた CO_2 を取込んでいると思われるが、その速度は C type と比べて遅かった。また細胞外で CO_2 を発生させるには炭酸脱水素酵素が用いられるが、この酵素の活性は、亜鉛欠乏で阻害される。C type の HCO_3^- 取込みには亜鉛は必要ないので、亜鉛が欠乏しやすい環境でも安定した円石形成と、光合成が可能である。

6. 窒素・リン供給条件：窒素およびリン制限実験により、共に類似した結果が得られたため、ここではリン制限実験についての結果のみを示す。P0 はリン無添加区を、また P1/10、P1/5 等はそれぞれコントロールにおけるリン濃度 ($40\mu\text{M}$) の 1/10、1/5 濃度であることを示している。P0 では両タイプとも 6 日目以降細胞数は増加しておらず、制限濃度になったと思われる(Figs. 7, 9)。このとき、C type では一細胞あたりの剥離円石数が大きく増加したが、その後は細胞数も一細胞あたりの剥離円石数も一定となった。このことから、リンが枯渇しそうになると円石の生産速度を速め、一時的に細胞を覆う円石の数を増加させ、その後は円石を剥離させないという応答を行っていたと考えられる。これは、貧栄養塩環境では沈降速度を大きくするという順応の表われだと考えられる。リン濃度が少ない条件では N type の無機炭素割合も上昇していることから、N type でも、貧栄養塩環境になると円石を形成し、沈降速度を上げようとする適応が残っていると思われる。

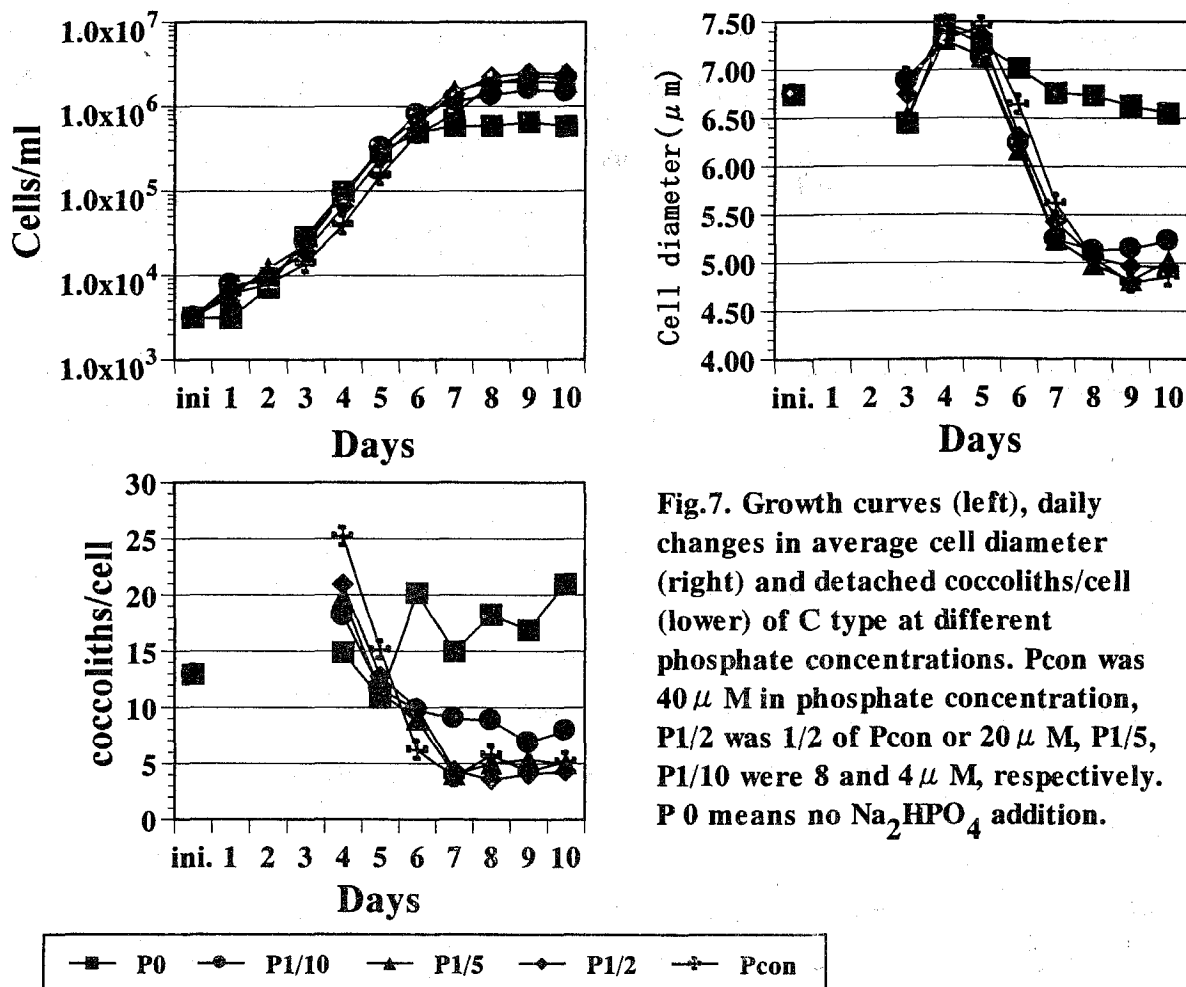


Fig. 7. Growth curves (left), daily changes in average cell diameter (right) and detached coccoliths/cell (lower) of C type at different phosphate concentrations. Pcon was 40 μM in phosphate concentration, P1/2 was 1/2 of Pcon or 20 μM , P1/5, P1/10 were 8 and 4 μM , respectively. P0 means no Na_2HPO_4 addition.

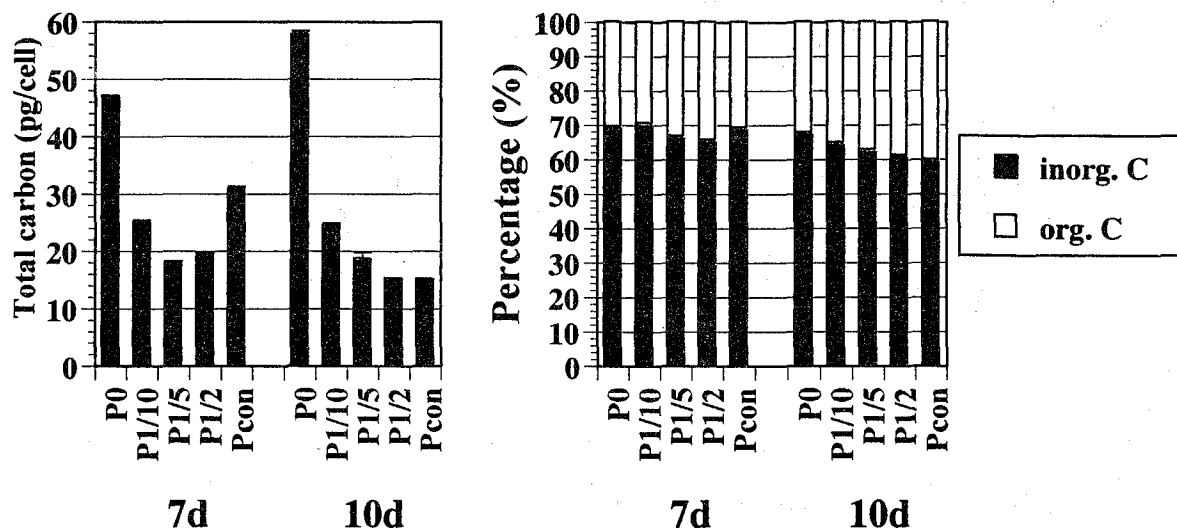


Fig. 8. Total C/cell and percentage of inorganic and organic C of C type of the coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* at different phosphate concentrations at 7th and 10th days.

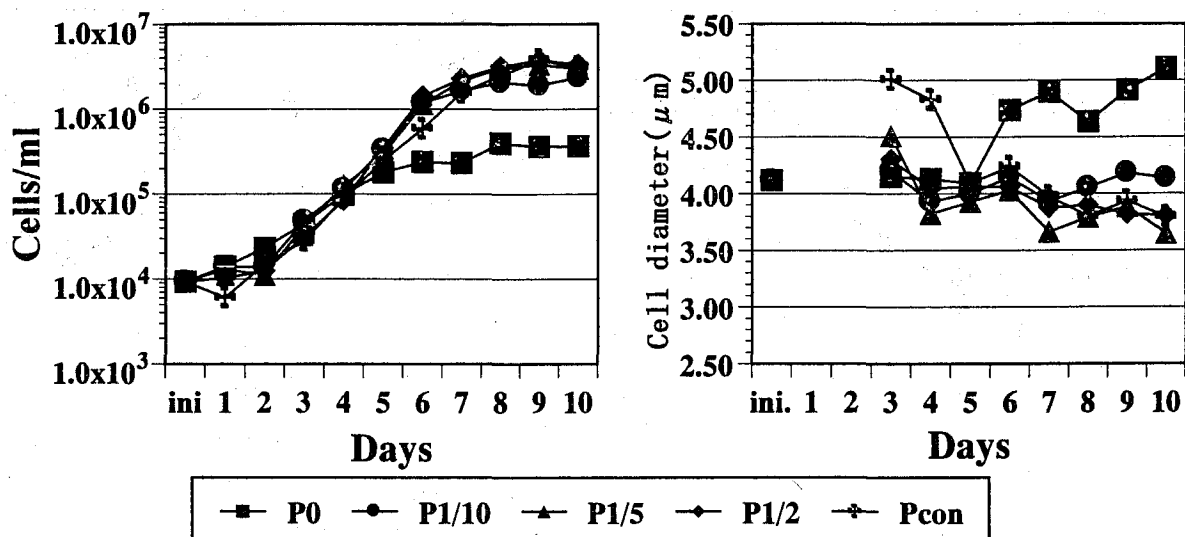


Fig. 9. Growth curves (left) and daily changes in average cell diameter (right) of N type of the coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* at different phosphate concentrations. Pcon was 40 μM in phosphate concentration, P1/2 was 1/2 of Pcon or 20 μM , P1/5 and P1/10 were 8, 4 μM phosphate. P0 means no Na_2HPO_4 addition.

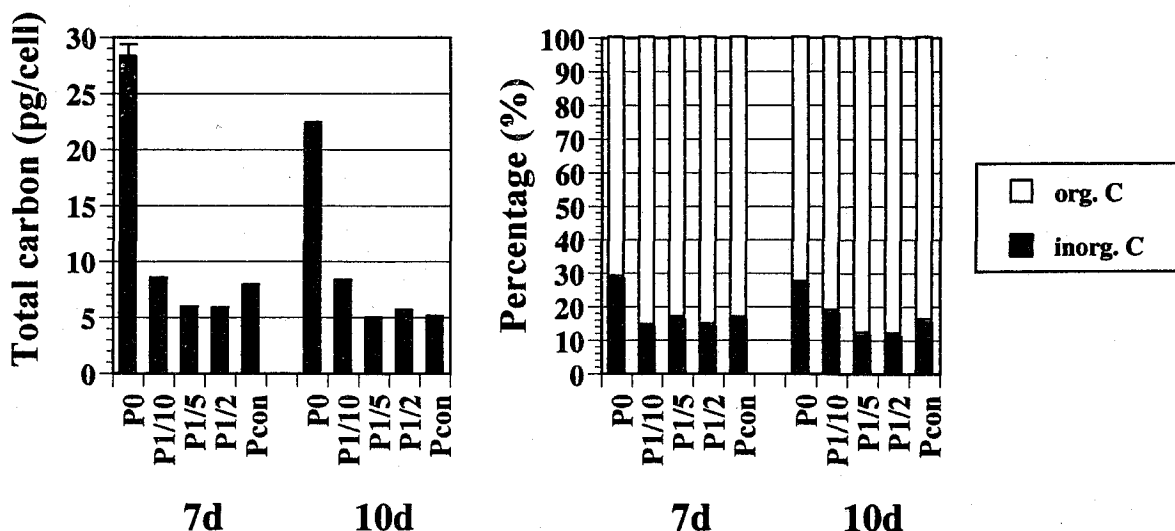


Fig. 10. Total C/cell (left) and percentage of inorganic and organic C (right) of N type at different phosphate concentrations at 7th and 10th days.

円石の枚数が増大し、体積が増大すればそれだけ沈降速度が速くなる。したがって、表層からより速く下層へ沈降移動することは、より豊かな栄養塩を利用するという意味で有利である。本実験の結果は、円石に浮力調整の働きがあるという Baumann et al. (1978); Wilbur and Watabe (1963); Linschooten et al. (1991) の仮説を裏付けるものと判断される。

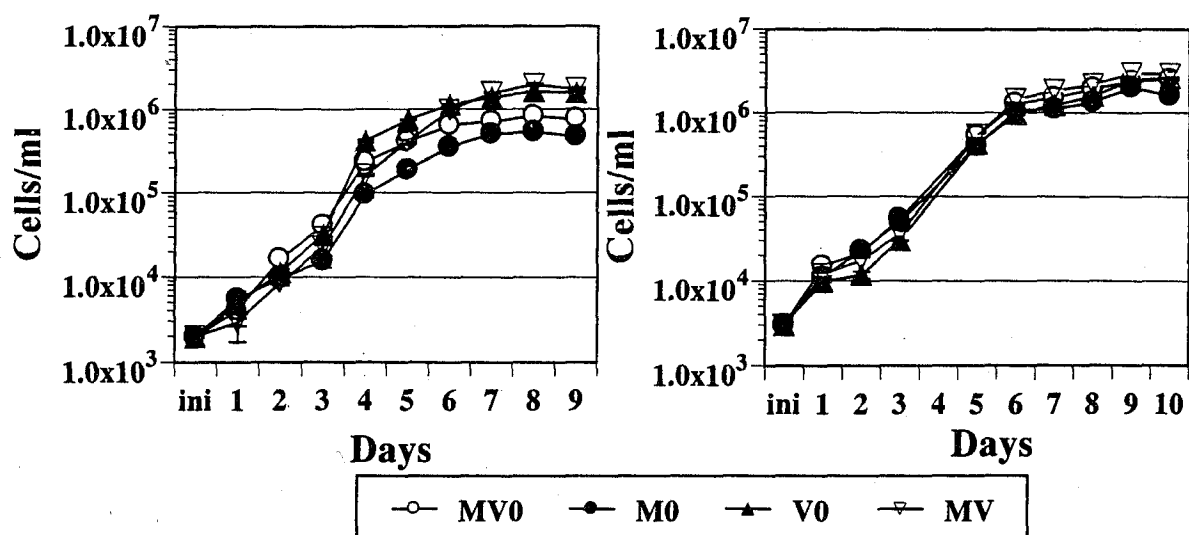


Fig. 11. Growth curves of C type (left) and N type (right) in the media added with mixture of trace metals and vitamins at different concentrations.

7. 微量金属およびビタミン類：微量金属（以下 M）およびビタミン類（以下 V）を異なる濃度に組み合わせて培養を行った結果、M が含まれる区 {V0、MV} と M を添加しなかった区 {MV0、M0} の細胞収量に大きな差が現れた(Fig. 11)。このことから、M を加えなければ、C type の細胞収量が増加しないことが明らかとなった。一方、N type では M の有無によって細胞収量に変化がなかったことから、C type の微量金属要求量が N type と比べて多いことが明らかになった。培地に添加した微量金属元素 Fe、Co、Mn、Cu の中に少なくとも一つは、C type の細胞収量を変化させる要因が含まれるといえた。

【おわりに】 N type と C type の環境応答の比較により、円石の機能的役割や円石形成株と非形成株とによる炭素固定速度および有機・無機成分合成の差異やその特徴が明らかになった。Table 1 に両タイプの特徴的な差異を示した。第一に、円石には浮力調整および集光の機能があることが理解された。また円石形成により一細胞あたりの炭素固定量は 2.5–5 倍程度増大するとともに光合成速度も速くなることが示された。本種の C type も円石を次々に生産しては落とししていくことから、円石が細胞保護の機能だけでなく、すばやく HCO_3^- を細胞内に吸収し、 CaCO_3 合成時に細胞内に発生する CO_2 を光合成に供する役割も果たしていると考えられた。この過程は亜鉛濃度に影響されないため、亜鉛が制限的になる環境においても安定した光合成を行うことができる。

今後は、円石藻が有する CO_2 固定除去能力を正しく評価する努力が行われる

ものと考えられるが、本研究の成果はその折に基礎的な知見を提供するものと期待される。

Table 1. Growth characteristics of C type and N type of the coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica*.

	C type	N type
Requirements of nutrients and trace metals	Higher	Especially low
Flotation control under low N and P concentrations	Sinking rate increased by restraint of detachment of coccoliths	Sinking rate increased by increasing inorganic materials other than coccolith
Light preference	Able to grow under lower light intensity	Adapt to higher light intensity
Partition of assimilated carbon	Mainly to coccoliths, but can change to photosynthetic upon environmental conditions	Mainly to photosynthetic
Source of carbon used for photosynthesis	CO₂ produced in the cell during calcification?	Extracellular CO₂
Response to variation of alkalinity	Active coccolith production under high alkalinity, consequently photosynthesis also increased	Active photosynthesis under high alkalinity
Amount of carbon assimilation	Higher due to coccolith formation	Lower (1/5–1/3 of C type)

論文審査結果要旨

円石藻は世界の大洋に分布する植物プランクトンで、炭酸カルシウムの円石を形成するため、光合成と円石形成の双方で CO_2 収支に関わっている。しかし、その培養は難しく、生理学的実験は未だ十分に行われていない。特に培養中に円石形成能を喪失するという性質は、円石の形成と機能に関する研究を阻害してきた。幸い水圏修復生態学研究室は円石形成能維持タイプ（C type）と円石を形成しないタイプ（N type）の双方を確保できたので、本研究が可能となった。

C typeは1995年に仙台湾から分離された、世界でもまれな円石形成培養株である。N typeは国立環境研究所から分与された。本研究では、まず両タイプの好適培養条件を定める予備研究を行った後、本実験として、炭酸塩添加と通気に対する増殖と細胞内炭素同位体比および炭素固定能の応答、窒素、リン、微量元素およびビタミン類の濃度変化に対する円石形成と増殖速度に見られる応答が、それぞれ両タイプ間で比較された。

得られた主な成果は以下のようであった。（1）光透過を阻止するはずの円石を有するC typeの方が弱光条件で良く増殖したので、円石が細胞内への集光装置として機能するという既報の仮説を直接的に証明できた。（2）一細胞当たり炭素量はC typeのほうが2－3倍高く、その60－65%を無機画分が占めたのに対して、N typeでは85－95%が有機画分であった。また、C typeのリン酸塩消費量はN typeに比べて約2倍大きく、円石形成にリンが関わっていることが示された。（3）両タイプとも容易に炭酸律速を受け、C typeは炭酸塩添加によって細胞当炭素量とりわけ無機画分（円石）を増加させるが、通気下では円石形成よりも光合成を優先させることが明らかにされた。また、（4）安定同位体比の解析はC typeの炭素要求量がN typeのそれに比べて大きいことを、 ^{13}C 実験は、chl.a量当たり有機炭素合成量は両タイプではほぼ同じだが、無機画分を含めた総炭素量はC typeで2.5－3倍高いことを示した。（5）円石への炭素取込速度が光合成の炭素固定よりも早いので、円石形成は細胞内に豊富な CO_2 プールを発生させ、それを光合成に利用する可能性が指摘された。（6）栄養塩律速条件では、C typeが円石を剥離させずに維持して沈降速度を大きくするという順応を有していること、また、N typeにも無機画分増加の順応が残っていることが推察された。

以上のように、円石の機能や円石の有無による炭素固定の差異を解析し、自然海洋において円石藻が円石を次々と生産しては剥離していることが複数の利得を生じていることを明らかにした。この知見は、他の植物プランクトンを抑えて円石藻が大規模なブルームを起こす機構、ひいては大気海洋間の CO_2 フラックスの解明に資するところが大きいものと評価できる。よって審査員一同は、農学博士の学位を授けるに値すると判断した。